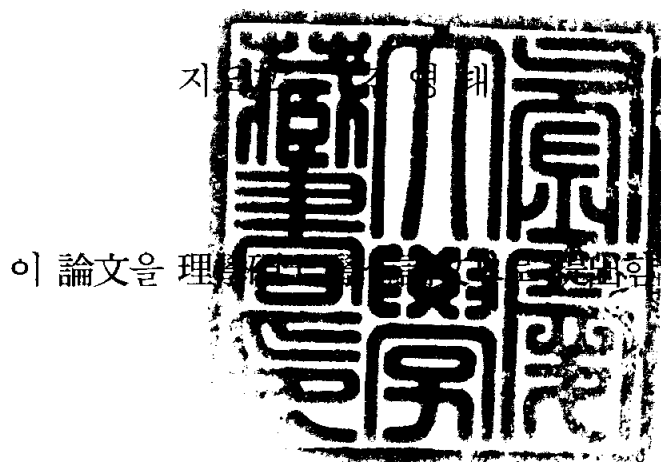


이학석사 학위논문

MycoExpress Triplex-PCR을 이용한
호흡기 검체의 Mycobacteria
직접검출의 평가



2003년 2월

부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

신 병 렬

이 논문을 신병렬의 이학석사
학위논문으로 인준함

2002년 12월

주 심 농학박사 김 진 상



위 원 이학박사 송 영 환



위 원 이학박사 김 영 태



목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	7
1. Primer design	7
2. PCR 반응액의 조성	12
3. Tested strains	14
4. 민감도를 평가하기 위한 임상검체	16
5. 특이도를 평가하기 위한 임상검체	17
III. 결 과	18
1. 균주를 이용한 1차 PCR 반응	18
2. 균주를 이용한 2차 PCR 반응	21
3. 마이코박테리아 감염증이 있는 환자 유래 임상검체에서 의 PCR 반응 결과	23

4. 마이코박테리아 감염증이 없는 호흡기질환 환자 유래 임상검체에서의 PCR 반응 결과	26
IV. 고 찰	27
V. 요약	30
VI. 참고문헌	33
VII. 감사의 글	37

List of Table

Table 1. Sequences of primers used in this study	8
Table 2. Mycobacteria ITS의 염기서열	10
Table 3. PCR profiles for amplification of ITS regions from mycobacteria	13
Table 4. Mycobacterial and non-mycobacterial strains used in this study	15
Table 5. The results MycoExpress Triplex PCR test of respiratory specimens	24

List of Figures

Fig 1. Schematic diagram for nested PCR of MycoExpress Triplex PCR	9
Fig 2. Genus -specific amplification of mycobacterial ITS by primers ITS-f F1 and ITS-R	20
Fig 3. Secondary PCR with pan-mycobacterial and <i>M. tuberculosis</i> and MAC-specific primers	22
Fig 4. The results of clinical samples positive for <i>M.tuberculosis</i> or MAC	25

Evaluation of Direct Detection of Mycobacteria in Respiratory Specimens using MycoExpress Triplex-PCR Technique

Byung-Ruel Shin

*Department of Industrial Microbiology, Graduate School of
Industry, Pukyong National University*

ABSTRACT

The methods for rapid and accurate identification are critical for the diagnosis of mycobacterial infections. Among mycobacterial pathogens, *Mycobacterium tuberculosis complex* and *Mycobacterium avium complex* (MAC) are the most convincingly known as pathogenic organisms. We report here new method for rapid and accurate identification and much sensitive detection for mycobacteria, *M. tuberculosis* and MAC. This method was evaluated as a direct and rapid technique for identification and characterization of mycobacteria from clinical specimens. The improval technique

was based on a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay.

The multiplex PCR technique is a triplex PCR method which uses three species-specific forward primers in combination with a genus-specific common reverse primer and template DNA taken from clinical specimens and cultured cells. This technique is used to amplify DNA fragments of internal transcribed spacer (ITS) region between 16S and 23S rRNA genes of mycobacteria. PCR was carried out with template DNAs taken directly from clinical specimens such as sputum, tissue, body fluid, urine and cultured cells. Primary PCR was carried out for amplification of ITS region of mycobacteria and the nested triplex PCR I was performed in a single tube for detection of mycobacteria, *M. tuberculosis*, and MAC. From the results designed by above experiments DNA fragments were expected to be a 320 bp, 133 bp, and 84 bp from the amplification by mycobacteria, *M. tuberculosis*, and MAC-specific primers, respectively. As expected, the triplex PCR using four primers was successfully able to detect mycobacteria, and identify *M. tuberculosis* and MAC in a single reaction. In case of *M. tuberculosis*, two specific bands corresponding to 320 bp and 133 bp were detected, whileas 320 bp and 84 bp fragments in MAC were amplified. Triplex PCR using specific primer sets for mycobacteria genus, *M. tuberculosis complex* and MAC was amplified two specific

M. tuberculosis complex and MAC was amplified two specific fragments and applied for detecting mycobacteria, *M. tuberculosis complex*, and MAC against clinical specimens. Also, this assay was able to use the simultaneous detection of mycobacteria genus, *M. tuberculosis complex*, and MAC in a single tube.

In conclusion, MycoExpress Triplex PCR method could be used in routine laboratory for early diagnosis of mycobacterial infection and for rapid identification of mycobacteria species from clinical specimens and cultured samples.

I. 서론

결핵(*M. tuberculosis*)은 전 세계적으로 연간 약 800만명의 환자가 새로 발생하고 300만명 이상이 사망하는 중요한 감염성 질환으로서 세계 보건 기구(World Health Organization, WHO)에서 인류의 건강에 심각한 영향을 끼치는 감염성 질환으로 지정한 질병 중의 하나이다(1). 이런 결핵의 발생율을 낮추거나 퇴치시키는데 있어 가장 중요한 요소는 결핵에 감염된 환자를 신속하고 정확하게 진단하여 조기 치료하는 것이다(2). 따라서 결핵 환자를 신속하고 정확하게 진단하기 위해서는 결핵균 원인균인 마이코박테리아(*mycobacteria*)를 신속하게 검출하는 것이 필요하다. 이러한 목적을 위해서 NAA 검사 (nucleic acid amplification test)가 개발되었는데 그 중 두가지 방법이 임상검체, 특히 호흡기 검체에서 결핵균을 직접 검출하는 방법으로 미국 식품의약청 (Food and Drug Administration, FDA)에 의해 공인을 받았다. 첫번째 방법은 E-MTD 시험법(Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test, E-MTD test)으로 Gen-Probe 사(San Diego, CA, USA)에서 개발한 방법으로 호흡기 검체에서 결핵균을 검출하는 민감도는 90.995.2이고 특이도는 98.8100로 보고되고 있다. 또 다른 방법은 Amplicor 시험법(Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test, Amplicor test)으로 Roche Diagnostic Systems 사(Branhburg, NJ, USA)에서 개발한 방법으로 호흡기 검체에서의 민감도는 90.995.2

이고 특이도는 99.699.8 정도로 보고되고 있다(3).

한편, 마이코박테리아 감염증 가운데 비결핵성 마이코박테리아 (non-tuberculous mycobacteria, NTM)에 의한 감염증의 경우 선진국에서는 결핵균보다 훨씬 높은 유병율을 보이고 있으며 이들 중 대부분은 *Mycobacterium avium complex* (MAC)에 의해 발생한다(4, 5). NTM의 임상 결과는 경우에 따라 결핵과 구분하기 힘들다, 치료 약제는 결핵의 치료 약제와 완전히 다르다(6). 따라서 NTM 감염증과 결핵성 원인균에 의한 질병에 대한 신속하고 정확한 진단 방법이 요구되고 있으나 앞에서 설명한 두가지 방법의 NAA 검사는 호흡기 검체로부터 MAC에 의한 감염증이나 그외 다른 NTM 감염증을 진단할 수 없다. 따라서 현재 수준에서는 NTM에 의한 감염증의 진단은 마이코박테리아를 배양해서 정확하게 동정될 때 까지 기다릴 수 밖에 없다. 이전 연구에 의하면 마이코박테리아의 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 존재하는 internal transcribed spacer (ITS) 부위가 마이코박테리아의 속-특이성 (genus-specific) 부분과 종-특이성 (species-specific)을 특징하는 특이 부분으로 보이는 염기서열을 모두 가지고 있어서 이 부위의 염기서열에 기초를 둔 분석법으로 결핵균을 포함한 마이코박테리아를 동정하는 PCR 방법이 개발되었다 (7, 8).

본 연구에서는 ITS 부위에 있는 속 특이적 및 종 특이적인 염기서열을 이용하여 호흡기 검체에서 한번의 반응으로 결핵, MAC 감염증 또는 그 외의 NTM 감염증을 직접 진단할 수 있는 새로운 PCR (MycoExpress Triplex PCR) 방법을 개발하였으며 이를 직접

호흡기 검체를 이용한 검사에 적용함으로써 이 방법의 민감도와 특이도를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. Primer design

Mycobacteria의 속 특이적 염기서열과 종 특이적 염기 서열은 총 33개의 마이코박테리아의 균종 (*M. avium*, *M. chelonae*, *M. conspicuum*, *M. farcinogenes*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. habana*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. lufu*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. paratuberculosis*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. senegalense*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. triplex*, *M. triviale*, *M. tuberculosis complex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, unidentified Mycobacterium species)에 대해서 GenBank에 등록되어 있는 57개의 ITS의 염기 DNA 서열을 조사하여 CLUSTAL-W (<http://genome.kribb.re.kr>) 프로그램을 이용하여 multiple alignment 방법으로 5개의 primer를 design하였다. 본 연구에서 사용한 primer의 종류는 Table 1에 정리하였고 PCR 반응에 의해 증폭된 염색체 상에서의 상대적인 위치에 대한 모식도는 그림 1에 나타내었다. 또한 mycobacteria의 ITS 염기서열에 대한 GenBank 자료를 Table 2에 정리하였다.

Table 1. Sequences of primers used in this study

Primers	Sequences	Utilization in the PCR
ITS-F 1	5'-CGAAGCCAGTGGC CTAACCC-3'	▷ primary reaction: forward primer ▷ secondary reaction: forward primer for mycobacteria
ITS-R	5'-TGGATCCTGCCAA GGCATCCACCAT-3'	▷ primary reaction: reverse primer
TBF1	5'-GGTGCATGACAAC AAAGTTGG-3'	▷ secondary reaction: forward primer for <i>M. tuberculosis</i>
MACF1	5'-ACAACACTCGGTC CATCCGT-3'	▷ secondary reaction: forward primer for MAC
mycom -2	5'-ATGCTCGCAACCA CTATCCA-3'	▷ secondary reaction: reverse primer for mycobacteria, <i>M. tuberculosis</i> and MAC

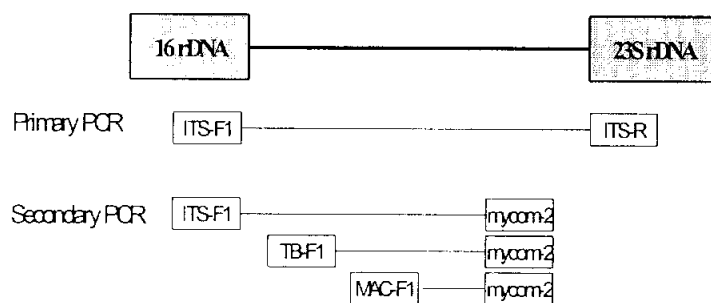


FIG. 1. Schematic diagram for nested PCR MycoExpress Triplex PCR

Table 2. Mycobacteria ITS의 염기서열

174 GTGGTGTTTGAGAATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCAA—TTGGA-TGCGCTGCGCTTTT-	<i>M. marinum</i>
176 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-ATGAG-CGCATGGTCTCGGT	<i>M. paratuberculosis</i>
226 GTGGTGTTTGATTGTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-TTCG—TGAG——AGTGT	<i>M. smegmatis</i>
213 GTGGTGTTTGAGAACTGGATAGTGGTTGCGAGCATC—A-ATGGA-TACGCTGCGCGCTA	<i>M. tuberculosis</i>
174 GTGGTGTTTGAGAATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCAA—TTGGA-TGCGCTGCGCTTTT-	<i>M. ulcerans</i>
173 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-ATGAG-CGCATGGTCTTGT	<i>M. avium</i>
241 GTGGTGTTTGATTGTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-CACG—CAG——AGTGT	<i>M. farcinogenes</i>
185 GTGGTGTTTGAGAATTGGATAGTGGTTGCGAGCATC-AA-ATGGA-TGCGTTGCGCGCA-	<i>M. gastri</i>
179 GTGGTGTTTGAGCATTTGAATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-ACGGA-TGCGTTGCG—CAG	<i>M. genavense</i>
166 GTGGTGTTTGAGAATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCAA-ATGTA-TGCGTTGTC-GTTC	<i>M. goodii</i>
180 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAA-ATGAA-CGCGTGCGCGCAA	<i>M. habana</i>
173 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-ATGAG-CGCATAGTCTTAG	<i>M. intracellulare</i>
176 GTGGTGTTTGAGAACTGGATAGTGGTTGCGAGCATC-AA-CTGGA-TGCGCTGCGGTTTG	<i>M. kansasii</i>
182 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAA-ATGGA-TGCGTTGTCAGTTA	<i>M. leprae</i>
173 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-ATGAA-CGCGTAGTCTTGG	<i>M. lifu</i>
173 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAA-AAGGA-TGCGCTGCGCGTAG	<i>M. malmoense</i>
184 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAGCAAGCA-AACTTGGTTGTTT	<i>M. shimoides</i>
179 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAA-ATGAA-CGCGTGCGCGGTAA	<i>M. simiae</i>
179 GTGGTGTTTGAGCATTTGAATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-AAGGA-TGCGTTGCGCAAGT	<i>M. triplex</i>
239 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAG-CAGA—TGAG——ATCTC	<i>M. triviale</i>
159 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAGCAAAAGACTGTGGTAAGCGGT	<i>M. xenopi</i>
174 GTGGTGTTTGAGAATTGGATAGTGGTTGCGAGCATC-AA-TTGGA-TGCGCTGCGCTCGT	<i>M. szulgai</i>
174 GTGGTGTTTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATCTAA-AAGGA-TGCGTGCGCG—AA	<i>M. scrofulaceum</i>
174 GTGGTGTTTGAGAACTGGATAGTGGTTGCGAGCATCAA—TGA-TACGCT-CGCGCTA	<i>M. africanum</i>

Primer의 DNA 염기서열을 고안함에 있어 고려한 점은 다음과 같다. 첫번째 고려사항은 대량으로 배양된 집락을 보이는 시료의 동정에 있어서는 검사의 민감도는 그렇게 중요하지 않고 특이도가 중요하다고 할 수 있지만, 상대적으로 적은 수의 균만을 포함하고 있는 임상검체에서 원하는 미생물을 검출하는 것은 민감도가 매우 중요하다. 따라서 민감도를 높이기 위해서 nested PCR 방법을 사용하여, 첫 번째 PCR 반응에서 전체 ITS 부분을 증폭시키고 난 후 두 번째 PCR 반응에서 속 특이적 혹은 종 특이적 부위를 나타내는 3개의 특이성 있는 부위의 DNA를 증폭하는 방법을 이용하였다. 첫 번째 PCR 반응에서 사용한 primer는 ITS-F1과 ITS-R이었다. 두 번째, 2차 PCR에서는 3가지의 특이적 부위에 해당하는 DNA 증폭산물을 복표로 하기 때문에 이론적으로는 6개의 primer가 추가로 필요하나 이처럼 한 반응에서 많은 수의 primer를 사용할 경우 예기치 않은 비특이적인 DNA증폭 (non-specific DNA amplification)이 있을 수 있기 때문에 필요한 primer의 수를 최소화하기 위하여 primer mycom-2를 3가지의 특이적인 증폭 DNA산물의 reverse primer로 동일하게 이용할 수 있도록 고안하였다. 이 primer들은 BioBasic Inc. (Toronto, Canada)에 주문 의뢰하여 50nmol의 농도로 제작하였다.

2. PCR 반응액의 조성

PCR 반응의 1차 반응액의 조성은 다음과 같다; 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0), 1% Triton X100, 각각 0.2 mM의 deoxynucleoside triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, and dCTP), 1.5 mM MgCl₂, 10 μ M TMAC, primers (ITS-F1과 ITS-R) primer 각각 10 pmol, 1 U의 Taq DNA polymerase (BioBasic).

1차 PCR의 반응 조건은 94°C에서 3분 동안 변성시킨 후 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 동안 20 cycle을 시행하였다. 그 후 충분히 증폭 반응이 완료될 수 있도록 72°C에서 10분간 반응시킨 후 정지시켰다.

2차 PCR의 반응액은 primer만 제외하고 1차 PCR의 반응액의 조성은 동일하였다. 2차 반응에 사용된 primer는 다음과 같다; ITS-F1 (2.5 pmol), TBF1 (5 pmol), MACF1 (10 pmol) 및 mycom-2 (15 pmol). 2차 PCR의 반응 조건은 94°C에서 3분 동안 변성시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 30 cycle을 시행하였다. 최종적으로 72°C에서 10분간 반응을 유지시킨 후 컸다. 반응액의 일부를 취하여 1.5% agarose gel 상에서 전기 영동한 다음 자외선 램프를 조사하여 전개된 DNA 절편들을 분석하였다. 표3에서는 1차와 2차 PCR 반응 profile을 요약하였다.

**Table 3. PCR profile for amplification of ITS regions
from mycobacteria**

1st PCR reaction profile

Step	Cycle	Temp	Time	Cycle ↑
1	Denaturation	94°C	3 min	1 cycle
	Denaturation	94°C	1 min	
2	Annealing	60°C	30 sec	20 cycles
	Extention	72°C	1 min	
3	Final extention	72°C	10 min	1 cycle

2nd PCR reaction profile

Step	Cycle	Temp	Time	Cycle ↑
1	Denaturation	94°C	3 min	1 cycle
	Denaturation	94°C	30 sec	
2	Annealing	62°C	30 sec	30 cycles
	Extention	72°C	30 sec	
3	Final extention	72°C	10 min	1 cycle

3. Tested strains

본 연구에서는 20종의 마이코박테리아 표준균주와 임상에서 분리된 118개의 *M. tuberculosis*와 87개의 NTM이 사용되었다 (Table 4). *M. tuberculosis*의 분리는 부산 B병원과 마산 M병원의 미생물 검사실에 보관된 임상시료로 균주 중에서 무작위로 선택했다. 임상분리 NTM 균은 WHO 지정 동아시아 지역 공인 검사기관인 대한결핵협회 결핵연구원에서 전통적인 생화학적 검사법에 의해 이미 동정된 균을 분양받아 사용하였다.

본 검사 방법의 특이성을 확인하기 위해 control로 포함시킨 마이코박테리아가 아닌 병원성 세균 혹은 진균은 부산의 B 병원의 미생물 검사실에서 임상 검체로부터 수집된 균주로, 균 검출 후 실험할 때까지 -70°C 에 냉동 보관하였으며 비교적 흔히 검출되는 병원성 미생물을 포함한 45개의 균주였다. 이 균주들의 동정은 전통적인 배양방법에 의해 API (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)와 Vitek (BioMérieux Vitek, Hazelwood, Mo., USA)와 같이 상용화된 시약이나 장비를 이용하여 생화학적으로 동정하였다.

Table 4. Mycobacterial and non-mycobacterial strains used in this study

<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)
<i>M. agri</i> ATCC 27406	<i>Burkholderia cepacia</i> (2)
<i>M. asiaticum</i> ATCC 25276	<i>Candida albicans</i> (2)
<i>M. austroafricanum</i> ATCC 33464	<i>Citrobacter freundii</i> (2)
<i>M. avium</i> ATCC 25291	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)
<i>M. bovis</i> ATCC 19210	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	<i>Enterococcus faecalis</i> (2)
<i>M. flavescens</i> ATCC 14474	<i>Enterococcus faecium</i> (2)
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	<i>Enterococcus raffinosus</i> (2)
<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	<i>Escherichia coli</i> (2)
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (2)
<i>M. plei</i> ATCC 354	<i>Proteus mirabilis</i> (2)
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	<i>Proteus vulgaris</i> (2)
<i>M. smegmatis</i> ATCC 21701	<i>Providencia rettgeri</i> (2)
<i>M. szulgai</i> ATCC 35799	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)
<i>M. terrae</i> ATCC 15755	<i>Rahnella aquatilis</i> (2)
<i>M. triviale</i> ATCC 23292	<i>Salmonella</i> spp. (2)
<i>M. tuberculosis H37Rv</i> ATCC 27294	<i>Serratia marcescens</i> (2)
<i>M. vaccae</i> ATCC 15483	<i>Shewanella putrefaciens</i> (2)
MAC clinical isolates (31)	<i>Shigella flexneri</i> (2)
<i>M. chelonae</i> clinical isolates (10)	<i>Shigella sonnei</i> (2)
<i>M. fortuitum</i> clinical isolates (13)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2)
<i>M. gordonae</i> clinical isolates (10)	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)
<i>M. scrofulaceum</i> clinical isolates (3)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (2)
<i>M. szulgai</i> clinical isolates (10)	<i>Streptococcus intermedius</i> (2)
<i>M. Terrae</i> clinical isolates (10)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (2)
<i>M. tuberculosis</i> clinical isolates (118)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (2)

4. 민감도를 평가하기 위한 임상 검체

2000년 12월부터 2001년 1월 사이에 부산 B 병원의 미생물 검사실에 마이코박테리아의 배양을 위해서 의뢰된 1196개의 호흡기 검체를이용하였다. 각각의 검체는 *N*-acetyl-L-cysteine(NALC)-2% NaOH 방법으로 점액질 용해와 오염균 제거를 동시에 시행하고 난 후의 100ul 의 침전물을 본 실험에서 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

본 연구에서는 결핵균 또는 NTM이 검출되는 검체를 이용하여 본 검사의 민감도를 측정하고자 하였으므로, 8주간의 배양 후 결과를 확인하여 항산성 염색(acid-fast bacilli or AFB stain)이 양성이거나 결핵균 또는 NTM 배양이 양성인 검체 총 115개(객담 104 검체, 기관지 세척액 11 검체)를 선택하였다. 배양된 마이코박테리아의 동정은 ITS의 종특이적 염기서열을 이용한 PCR 방법으로 실시하였다(8). 115개의 검체가 유래된 환자에서 결핵 또는 NTM 감염 여부를 확인하기 위한 의무 기록의 검토는 호흡기 내과 전문의의 도움을 받아 실시하였다. 115개 호흡기 검체중 113개 검체는 폐결핵이나 속립성 결핵을 가진 44명의 환자로부터 유래한 것이었고, 나머지 2개 검체는 MAC에 감염된 환자에서 유래한 것이었다. 보관된 검체로부터 DNA의 추출은 InstaGene matrix kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

5. 특이도를 평가하기 위한 임상 검체

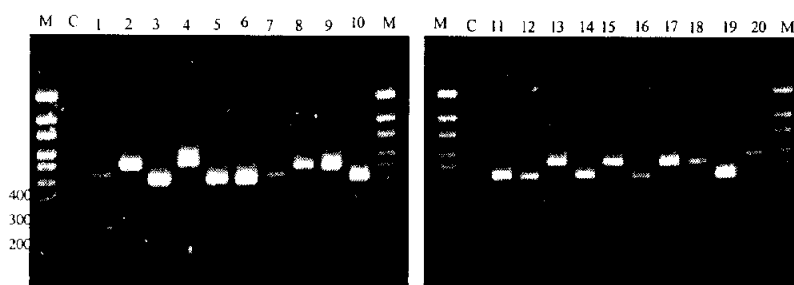
본 검사의 특이도를 확인하기 위하여 실시한 결핵이나 NTM 감염증이 없는 환자의 검체에 대한 검사는, 결핵을 포함한 마이코박테리아 감염증이 없는 그 외의 호흡기 질환으로 입원한 50명의 환자로부터 채취한 객담 각각의 검체를 *N*-acetyl-L-cysteine (NALC)-2% NaOH 방법으로 점액질 용해와 오염균 제거를 동시에 시행하고 난 후의 100ul 의 침전물을 본 실험에서 사용하기 전까지 -70°C에 보관한후 전통적인 배양방법 및 동정방법의 결과와 PCR 방법의 결과를 비교하였다.

III. 결과

1. 균주를 이용한 1차 PCR 반응

16S rDNA에 위치한 forward primer인 ITS-F1과 23S rDNA에 위치한 reverse primer인 ITS-R를 이용하여 전체 ITS 부위를 증폭시킨 결과 1차 PCR 반응에서 그림 2에서 보여주는 바와 같이 band size가 410~600bp로 20개의 모든 마이코박테리아 표준 균주 (Lane 1, *M. abscessus* ATCC 19977; lane 2, *M. agri* ATCC 27406; lane 3, *M. asiaticum* ATCC 25276; lane 4, *M. austroafricanum* ATCC 33464; lane 5, *M. avium* ATCC 25291; lane 6, *M. bovis* ATCC 19210; lane 7, *M. chelonae* ATCC 35752; lane 8, *M. flavescens* ATCC 14474; lane 9, *M. fortuitum* ATCC 6841; lane 10, *M. gordonae* ATCC 14470; lane 11, *M. intracellulare* ATCC 13950; lane 12, *M. kansasii* ATCC 12478; lane 13, *M. phlei* ATCC 354; lane 14, *M. scrofulaceum* ATCC 19981; lane 15, *M. smegmatis* ATCC 21701; lane 16, *M. szulgai* ATCC 35799; lane 17, *M. terrae* ATCC 15755; lane 18, *M. triviale* ATCC 23292; lane 19, *M. tuberculosis* H37Rv; lane 20, *M. vaccae* ATCC 15483) 에서 특이 band가 관찰되었다. 또한 118개의 결핵균 임상분리 균주와 87개의 NTM임상분리 균주 모두에서 특이적인 ITS band가 관찰되었다. 반면 대조균으로 사용한 장내세

균, 포도당 비발효 그람음성 간균, 포도상구균, 연쇄구균, 칸디다균 등을 포함하는 검사 대상이 된 병원성 세균 및 진균 55균주 중 어느 균주에서도 비특이적인 증폭은 관찰되지 않았다.



FI

G. 2. Genus-specific amplification of mycobacterial ITS by primers ITS-F1 and ITS-R.

Lanes M, 100-bp size markers; C, negative control; 1, *M. abscessus* ATCC 19977; 2, *M. agri* ATCC 27406; 3, *M. asiaticum* ATCC 25276; 4, *M. austroafricanum* ATCC 33464; 5, *M. avium* ATCC 25291; 6, *M. bovis* ATCC 19210; 7, *M. chelonae* ATCC 35752; 8, *M. flavescens* ATCC 14474; 9, *M. fortuitum* ATCC 6841; 10, *M. gordonae* ATCC 14470; 11, *M. intracellulare* ATCC 13950; 12, *M. kansasii* ATCC 12478; 13, *M. phlei* ATCC 354; 14, *M. scrofulaceum* ATCC 19981; 15, *M. smegmatis* ATCC 21701; 16, *M. szulgai* ATCC 35799; 17, *M. terrae* ATCC 15755; 18, *M. triviale* ATCC 23292; 19, *M. tuberculosis* H37Rv; 20, *M. vaccae* ATCC 15483.

2. 균주를 이용한 2차 PCR 반응

마이코박테리아의 전체 ITS에 대한 1차 PCR 결과 얻어진 DNA영역에 대하여 2차로 속 특이성과 종 특이성을 조사하기 위해 증폭된 전체 ITS의 부위를 주형 DNA로 사용하여 2차 PCR 반응을 실시하였다. 그 결과 마이코박테리아에 대한 2차 PCR의 특이적 증폭의 결과는 그림 3과 같다. 결핵균과 *M. bovis*의 경우, 322 bp 크기의 속 특이적인 pan-mycobacterial band와 결핵균에 특이적인 133 bp 크기의 두 band가 관찰되었다.

*M. avium*과 *M. intracellulare*에서는 모두 같이 322 bp 크기의 속 특이적인 pan-mycobacterial band와 MAC에 특이적인 84bp 크기의 종 특이적인 두 band가 관찰되었다.

M. fortuitum, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. malmoense*를 비롯한 그 외 마이코박테리아에서는 균종 별로 다소 크기가 다르나 모두 300~350bp정도의 속 특이적인 pan-mycobacterial band가 관찰되었다.

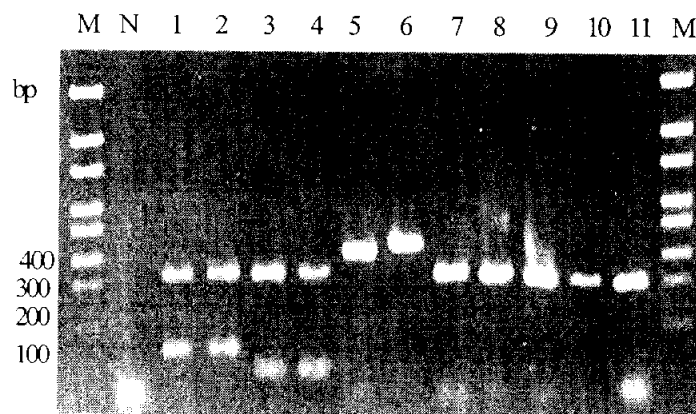


FIG. 3. Secondary PCR with pan-mycobacterial and *M. tuberculosis*- and MAC-specific primers.

M, 100bp DNA ladder molecular size maker; N, negative control; 1, *M. Tuberculosis* H37Rv; 2, *M. bovis*; 3, *M. avium*; 4, *M. intracellulare*; 5, *M. fortuitum*; 6, *M. terrae*; 7, *M. scrofulaceum*; 8, *M. kansasii*; 9, *M. szulgai*; 10, *M. xenopi*; 11, *M. malmoense*.

3. 마이코박테리아 감염증이 있는 환자 유래 임상 검체에서의 PCR 반응 결과

115개의 호흡기 검체에 대한 MycoExpress Triplex PCR 검사 결과는 Table 5에 정리하였다. 결핵 환자의 검체 중 Acid Fast Bacilli (AFB) 염색이 음성이고 결핵균 배양이 양성인 것은 57개였는데, 이 중 40개에서 본 검사에서 결핵균에서 보이는 2개의 특이 band를 보여 70.2%의 민감도를 나타내었다. AFB 염색이 양성이면서 결핵균 배양이 양성인 41 검체 중에서는 모두, 그리고 AFB 염색이 양성이면서 오염균의 배양(*M. fortuitum*이 배양된 예1), 배지의 오염 또는 배양이 음성인 15 검체 중에서는 예13에서 결핵균에서 보이는 2개의 특이 band를 보여 96.4% (54/56)의 민감도를 나타내었다. MAC에 감염된 두 환자의 검체는 모두 MycoExpress Triple test에서 MAC에 특이적인 두개의 band를 보여주었다. 일부 임상 검체의 검사 결과 특이적인 band들이 나타났고 이들은 그림 4에 정리하였다.

Table 5. The results of MycoExpress Triplex PCR test of respiratory specimens

N, negative; P, positive.

Diagnosis	AFB stain	Culture	MycoExpress Triplex PCR	No.of specimens
Tuberculosis (113)	N	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	40
	P	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	41
	P	Contamination	<i>M. tuberculosis</i>	5
	P	No growth	<i>M. tuberculosis</i>	7
	P	<u><i>M. fortuituma</i></u>	<u><i>M. tuberculosis</i></u>	1
	N	<i>M. tuberculosis</i>	N	17
	P	No growth	N	2
MAC infection (2)	N	MAC	MAC	2

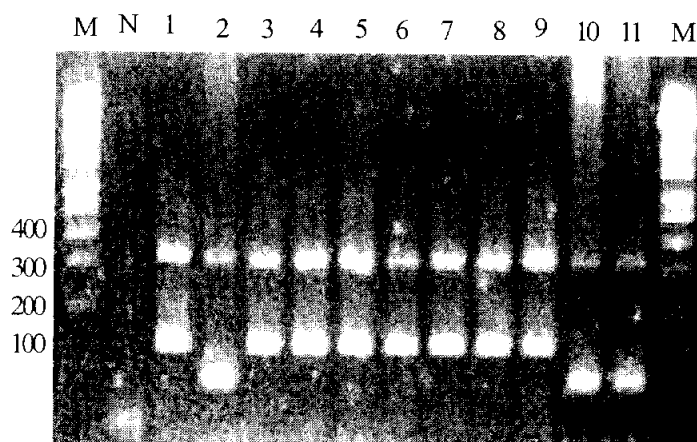


FIG. 4. The results of clinical samples positive for *M. tuberculosis* or MAC.

M, 100bp DNA ladder molecular size maker; N, negativecontrol; 1, *M. Tuberculosis* H37Rv; 2, *M. avium* ATCC25291; 3-9, *M. tuberculosis*-positive clinical samples; 10-11, MAC-positive clinical samples.

4. 마이코박테리아 감염증이 없는 호흡기 질환 환자 유래 임상 검체에서의 PCR 반응 결과

마이코박테리아 감염증이 없는 호흡기질환 환자로부터 유래한 50개의 객담을 검사한 결과, 하나의 검체에서만 MycoExpress Triplex test 결과 결핵균의 양상이 양성이 나와서, 본 검사의 특이도는 98.0%였다.

IV. 고찰

결핵의 유병율이 높은 지역에서의 이민에 의한 인구유입과 이동인구의 증가 등의 요인으로 1990년대 초 이후 미국에서는 폐결핵의 유병율이 다시 증가하고 있는 추세에 있으며, 우리나라에서도 흉부 방사선 촬영에 의한 전국 결핵 실태 조사에서 결핵의 유병율이 다시 점차적으로 증가하고 있다. 이런 점을 감안할 때 결핵의 관리에 대한 대책이 강화되어야 할 것이다. 폐결핵으로 인한 의료 경제적 손실은 상당하며 이환율, 사망률 또한 높으므로 신속하고 정확한 검사에 기초한 조기진단과 치료가 중요하다.

결핵의 진단이 고전적이고 일반적인 방법인 항산균 도말 검사와 결핵균 배양 검사는 상호 보완적이며 필수적인 방법이나 이러한 검사만으로는 결핵균의 정확한 진단에 어려움이 많다. 항산균 도말 검사는 결핵균을 빨리 동정할 수 있고 전염성의 정도를 알 수 있다는 장점이 있으며, 결핵균 배양검사는 항산균 도말 검사보다 적은 균 수에서도 검출할 수 있다는 장점이 있으나 약 3-6주 정도의 기간이 필요하다는 단점이 있다.

초기에 빠르고 정확한 결핵의 진단은 결핵의 관리와 예방에 중요한 과정일 뿐만 아니라 임상의학의 경험에 의존하는 치료 방법에 따른 환자에 대한 과잉 또는 부적절한 치료를 막을 수 있도록 하기 위해 상용화된 2개의 NAA test 방법 (E-MTD 와 Amplicor Test)들이 새로이 개발되었고 이 방법들의 시행이 항산성균 도말검

사 양성인 검체에서는 꽤 좋은 결과를 보여주었다. E-MTD test의 평가를 보면, 특이도가 77.8%인 하나의 연구를 제외하고는 민감도는 91.7%~ 100%이고 특이도는 100%를 보여주었다(3, 9, 11). Amplicor test의 민감도는 95.4%~98.9%이고 특이도는 90.9%~100%로 보고되었다(2, 8, 9, 11, 13). 하지만 최근의 결핵 진단이 결핵균 성장 의존으로 가는 경향이 있지만 일부 보고에서는 방사선학적 진단같은 임상검사로 결핵으로 진단된 환자의 약 50%에서 결핵균 유전자 (gene of *Mycobacterial tuberculosis*) 가 검출되지 않았다고 한다. 이것은 객담을 거의 배출하지 못하거나 또는 아예 객담을 배출 못하는 환자나 흡연으로 결핵균이 호합 되지 않은 객담을 만드는 폐 결핵 환자에서 NAA test에 의한 유전자 증폭의 제한점을 제시한다 하겠다. 본 연구에서는 항산성균 도말 염색 양성인 호흡기 검체에 있어 결핵의 진단을 위해 상용적으로 이용할 수 있는 위의 2가지 상품에 필적하는 결과를 보이는 MycoExpress Triplex PCR 방법을 증명하였다. 항산성균 도말염색 음성인 호흡기 검체에서의 MycoExpress Triplex PCR도 또한 위의 두가지 검사방법과 거의 같은 민감도를 보였다. 이 MycoExpress Triplex PCR 은 다양한 non-mycobacterial 호흡기질환을 가진 환자의 검체에서 우수한 특이도를 보여주었고 흔히 분리되는 미생물 미생물들을 관찰한 결과 위양성은 없었다. 또한 흉강액이나 뇌척수액, 드물게 의뢰되는 다른 검체의 경우 세균학적으로 의미가 없는 소량이기 때문에 이 방법으로는 평가할 수 없었다. 그러나 MycoExpress Triplex PCR은 적어도 호흡기검체의 신속하고 빠르고 정확한 결핵진단에는 분명히 우

수한 방법이다.

MAC에 의한 감염은 가장 일반적이고 중요한 NTM 감염증이다. 이러한 세균들은 AIDS 환자나 기저 폐질환을 가진 고령의 남성과 폐 질환의 병력이 없는 여성 등 다양한 사람들에게서 감염증을 일으킬 수 있는 기회감염성 병원균이다(12). 많은 연구논문들이 NAA test방법들에 의한 마이코박테리아 균주의 동정 뿐만 아니라 임상검체에서 분리된 결핵균의 직접검출에 초점이 맞춰져있다. 그러나 NTM의 직접검출은 불가능하다. 이 연구에서는 결핵균 뿐만 아니라 MAC도 검출할 수 있다. 더구나 종-특이적(genus-specific) band는 하나의 반응에서 결핵균이나 MAC의 대안적인 확인을 제공할 뿐만 아니라 다른 마이코박테리아 감염의 연역적 추론을 제공했다. 비록 한국에서는 NTM 감염증이 드물기 때문에 MAC 환자로부터 단 2개의 검체만을 검사할 수 있었지만 이 2검체는 MAC를 가지고있는 것으로 밝혀졌다. 비록 비결핵성 마이코박테리아 감염증을 가진 다양한 환자의 검체를 가지고 앞으로 더 많은 연구가 필요하지만 우리는 적어도 호흡기 검체로부터 마이코박테리아의 직접검출이 현재의 검사법으로 가능하다고 간주할 수 있다.

V. 요약

배경: 본 연구에서는 ITS 부위에 있는 속 특이적 및 종 특이적인 염기서열을 이용하여 호흡기 검체에서 한번의 반응으로 결핵, MAC 감염증 또는 그 외의 NTM 감염증을 직접 진단할 수 있는 새로운 PCR(MycoExpress Triplex PCR) 방법을 개발하였으며 이를 직접 호흡기 검체를 이용한 검사에 적용함으로써 이 방법의 민감도와 특이도를 조사하였다.

방법: 본 연구에서는 20종의 마이코박테리아 표준균주와 임상에서 분리된 118개의 *M. tuberculosis*와 87개의 NTM이 사용되었다. *M. tuberculosis*의 임상분리는 부산 B병원과 마산 M병원의 미생물 검사실에 보관된 균주를 무작위로 선택했으며 임상분리 NTM 균은 WHO 지정 동아시아 지역 공인 검사기관인 대한결핵협회 결핵연구원에서 전통적인 생화학적 검사법에 의해 이미 동정된 균을 분양받아 MycoExpress Triplex PCR을 시행하였다. 또한 민감도를 측정하기 위해 2000년 12월부터 2001년 1월 사이에 부산 B 병원의 미생물 검사실에 마이코박테리아의 배양을 위해서 의뢰된 1196개의 호흡기 검체를 이용하였다. 또한, 본 검사 방법의 특이성을 확인하기 위해서는 결핵을 포함한 마이코박테리아 감염증이 없는 그 외의 호흡기 질환으로 입원한 50명의 환자로부터 채취한 객담을 이용하여 PCR을 시행하였다.

결과:

1. 균주를 이용한 1차 PCR 반응

20개의 모든 마이코박테리아 표준균주에서 특이 band가 관찰되었고 118개의 결핵균 임상분리 균주와 87개의 NTM임상분리 균주 모두에서 특이적인 ITS band가 관찰되었다. 반면 control 균으로 사용한 장내세균, 포도당비발효 그람음성 간균, 포도상구균, 연쇄구균, 칸디다균 등을 포함하는 검사 대상이 된 병원성 세균 및 진균 55균주 중 어느 균주에서도 비특이적인 증폭은 관찰되지 않았다.

2. 균주를 이용한 2차 PCR 반응

결핵균과 *M. bovis*의 경우, 322 bp 크기의 속 특이적인 pan-mycobacterial band와 결핵균에 특이적인 133 bp 크기의 두 band가 관찰되었고 *M. avium*과 *M. intracellulare*에서는 모두 같이 322 bp 크기의 속 특이적인 pan-mycobacterial band와 MAC에 특이적인 84bp 크기의 종 특이적인 두 band가 관찰되었다. *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. malmoense*를 비롯한 그 외 마이코박테리아에서는 균종별로 다소 크기가 다르나 모두 300~350bp 정도의 속 특이적인 pan-mycobacterial band가 관찰되었다.

3. 마이코박테리아 감염증이 있는 환자 유래 임상 검체에서의 PCR 반응 결과 결핵 환자의 검체 중 Acid Fast Bacilli (AFB) 염색이 음성이고 결핵균 배양이 양성인 것은 57개였는데, 이 중 40개에서 본 검사에서 결핵균에서 보이는 2개의 특이 band를 보여 70.2%

의 민감도를 나타내었다. AFB 염색이 양성이면서 결핵균 배양이 양성인 41 검체 중에서는 모두, 그리고 AFB 염색이 양성이면서 오염균의 배양 (*M. fortuitum*이 배양된 1예), 배지의 오염 또는 배양이 음성인 15 검체 중에서는 13예에서 결핵균에서 보이는 2개의 특이 band를 보여 96.4% (54/56)의 민감도를 나타내었다. MAC에 감염된 두 환자의 검체는 모두 MycoExpress Triplex test에서 MAC에 특이적인 두개의 band를 보여주었다.

VI. 참고문헌

1. Maher, D. and Mario, R. (1999) The global epidemic of tuberculosis, a World Health Organization prospective, *In Tuberculosis and nontuberculous infections.* p. 104-115. D. Schlossberg (ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
2. Doern, G. V (1996) Diagnostic mycobacteriology: where are we today? *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1873-1876
3. Soini, H. and Musser, J. M. (2001) Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.*, 47: 809-14.
4. Shinnors, D. and Yrager, H. Jr (1999) Nontuberculous mycobacterial infection: Clinical syndromes and diagnosis, overview. *In Tuberculosis and nontuberculous infections.* p. 341-350. D. Schlossberg (ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
5. Wallace, R. J. Jr (1996) Nontuberculous mycobacterial infections in the HIV-negative host. *In Tuberculosis.* p. 699-709.

W. N. Rom and S. M. Garay (ed.) Little, Brown and Company, Boston.

6. Yeager, H. Jr, and Reddy D. V. (1996) Nontuberculous mycobacteria, *In Current therapy of infectious disease*. p. 475-477 D. Schlossberg (ed.) Mosby, St. Louis.

7. Chang, C. L., Son, H. C. Kim, S. H. Kim, C. N. Chung, B. S. Park, S.K. Park, H. K. Jang, H. J., and Song, S. D. (2000) Detection of mycobacteria by amplifying the internal transcribed spacer regions with novel genus-specific primers. Proceedings of the Congress of Pathology and Laboratory Medicine XX World-IV Mercosul- XXXIII Brazilian. p.19-23. M. Evaldo (ed), Monduzzi Editore, San Paulo, Brazil.

8. Park, H., Jang, H., Kim, C., Chung, B., Chang, C. L., Park, S. K., and Song, S. (2000) Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Region with Genus- and Species-Specific PCR Primers. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4080-4085

9. Scarparo, C., Piccoli, P., Rigion, A., Ruggiero, G., Scagnelli, M., and Piersimoni C. (2000) Comparison of enhanced Mycobacterium

tuberculosis amplified direct test with COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis assay detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1559-62.

10. Bergmann, J. S. and Woods G. L. (1996) Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR Mycobacterium tuberculosis test for detection of M. tuberculosis in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1083-5.

11. Wallace, R. J., Jr (1996) Nontuberculous mycobacterial infections in the HIV-negative host. *In Tuberculosis*. p. 699-709. W. N. Rom and S. M. Garay (ed.), Little, Brown and Company, Boston.

12. Beggs, M. L., Stevanova, R., and Eisenach, K. D. (2000) Species identification of Mycobacterium avium complex isolates by a variety of molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 508-12.

13. Chang, C. L., Kim, H. H., Son, H. C., Park, S. S., Lee, M. K., Park, S. K., Park, W. W., and Jeon C. H. (2001) False-positive growth of Mycobacterium tuberculosis attributable to laboratory

contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 5: 861-7.

14. Reischl, U., Lehn, N., Wolf, H., and Naumann L. (1998) *Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. J. Clin. Microbiol.*, 36: 4080-4085

VII. 감사의 글

잔잔한 미소로 항상 아낌없는 지도와 격려를 해주신 김영태 지도교수님께 무한한 감사를 드리며 많은 가르침과 논문의 부족한 점을 보완해 주신 김진상 교수님, 송영환 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 대학원 재학중 여러 가지 많은 도움과 지도를 아끼지 않으신 산업미생물학과 이원재, 이훈구, 이명숙, 최태진 교수님께 감사드립니다.

지금까지 많은 조언과 실험을 도와주신 부산대학교병원 임상병리과 장철훈 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

바쁘신 중에도 병력지 검토, 검체수집 등 많은 어려운 작업들을 세심하게 도와주신 부산대학병원 임상병리과 의국의 박태성 선생님께도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 오늘의 저를 있게 해주신 어머니, 아버지와 따뜻한 마음으로 격려해준 가족들에게 감사드리며 위 모든 분들에게 이 논문을 바칩니다.

2003. 1